



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Patentschrift  
10 DE 42 27 454 C 1

51 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
G 01 N 33/50  
G 01 N 33/53  
C 07 K 7/36  
A 61 K 37/02  
A 61 K 49/00

21 Aktenzeichen: P 42 27 454.0-52  
22 Anmeldetag: 19. 8. 92  
43 Offenlegungstag: —  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 3. 2. 94

DE 42 27 454 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Henning Berlin GmbH Chemie- und Pharmawerk,  
12099 Berlin, DE

74 Vertreter:

Andrae, S., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 81541 München;  
Flach, D., Dipl.-Phys., 83022 Rosenheim; Haug, D.,  
Dipl.-Ing.; Kneißl, R., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,  
Pat.-Anwälte, 81541 München

72 Erfinder:

Bohuon, Claude, Prof., Paris, FR

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 1 15 459 A2  
Surgery, Dez. 1990, 108 (6), S. 1097-1101;

54 Verfahren zur Früherkennung, zur Erkennung des Schweregrads sowie zur therapiebegleitenden  
Verlaufsbeurteilung einer Sepsis sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens

57 Verfahren zur Früherkennung, zur Erkennung des Schweregrads sowie zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung einer Sepsis, bei dem man in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten den Gehalt des Peptids Procalcitonin und/oder eines daraus gebildeten Teilpeptids, das nicht das reife Calcitonin ist, bestimmt und aus der festgestellten Anwesenheit und Menge des bestimmten Peptids auf das Vorliegen einer Sepsis, ihren Schweregrad und/oder den Erfolg einer therapeutischen Behandlung zurückschließt.

DE 42 27 454 C 1

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sepsisdiagnose, und zwar insbesondere zur Früherkennung und zur Erkennung des Schweregrads einer Sepsis sowie zur begleitenden Überwachung des therapeutischen Erfolgs einer Sepsisbehandlung, das auf der neuen Erkenntnis beruht, daß ein bestimmtes, an sich bekanntes Peptid sowie ggf. bestimmte seiner Fragmente zuverlässige, in hohen Konzentrationen auftretende und relativ einfach nach klassischen Nachweistechiken bestimmbare Biomarker für derartige Erkrankungen darstellen.

Unter dem Begriff "Sepsis", wie er in der vorliegenden Anmeldung verwendet wird, werden im Einklang mit einer moderneren Auffassung von dieser Erkrankung Krankheitsbilder zusammengefaßt, bei denen in der Regel Fieber, Leukozytose, Bewußtseinsveränderungen, ein hyperdynamischer Kreislauf ("warmer Schock") und ein hypermetabolischer Zustand, meist als Folge der Invasion normalerweise steriler Gewebe durch Mikroorganismen, beobachtet werden, während der früher als charakteristisch für eine Sepsis angesehene positive Nachweis von Erregern im Blut in seiner Bedeutung für die Diagnose "Sepsis" zurückgetreten ist.

In klinischen Studien konnte nämlich gezeigt werden, daß die Prognose von Patienten mit Sepsis nicht vom Ausmaß einer Infektion, insbesondere bakteriellen Infektion, sondern vom Schweregrad der septischen Reaktion des Organismus abhängt (vgl. G. Pilz, S. Fateh-Moghadam und K. Werdan in: *Krankenpflege-Journal* 29 (1991), S. 483—492 und darin zitierte Literaturstellen). Zur Sepsisbeurteilung werden daher heute zusätzlich zur positiven Blutkultur bzw. an deren Stelle verschiedene Laborparameter und hämodynamische Parameter ermittelt und zur Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung herangezogen, ggf. unter Anwendung von computergetstützten sog. Score-Systemen wie dem in der obigen Literaturstelle beschriebenen Apache (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II-Score. Es ist jedoch noch kein als zuverlässiger Biomarker geeigneter Einzelparameter bekannt, dessen Bestimmung für eine Sepsisdiagnose eine hohe Aussagekraft aufweist. Alle bisherigen Parameter weisen entweder eine unzureichende Spezifität auf oder gestatten keine zuverlässige Beurteilung des Schweregrads einer Sepsis und keine Therapieüberwachung, und zusätzlich ist die Bestimmung von Substanzen wie dem Tumornekrosefaktor (TNF) oder von Interleukinen wie dem Interleukin 6 (IL-6) zu kompliziert, kostenaufwendig und/oder zeitaufwendig für eine Bestimmung am Krankenbett.

Es besteht daher weiterhin ein dringender Bedarf nach einem zuverlässigen, relativ einfach zu bestimmenden Biomarker, dessen qualitative und insbesondere quantitative Bestimmung einen hohen Aussagewert für die Diagnosestellung und die Verlaufsbeurteilung bei Sepsis hat.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Früherkennung und zur Erkennung des Schweregrads einer Sepsis zu schaffen, bei dem auf auch unter klinischen Verhältnissen praktikable Weise ein neuer Biomarker bestimmt wird, dessen Bestimmung für die Diagnosestellung und Verlaufsbeurteilung einer Sepsis hochrelevante Ergebnisse liefert.

Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren und ein Mittel gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 12 gelöst. Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß das als solches bekannte Peptid Procalcitonin sowie ggf. gewisse seiner höhermolekularen Spaltprodukte hochrelevante Biomarker für Sepsis darstellen und ihre Konzentrationen in Proben von biologischen Flüssigkeiten von Patienten mit hoher Aussagekraft Schlüsse auf den Schweregrad einer septischen Erkrankung erlauben und damit wertvolle Parameter für die Verlaufsbeurteilung und Therapieüberwachung bei Sepsis darstellen.

Die Möglichkeit einer Sepsisdiagnose unter Bestimmung des Peptids Procalcitonin ist deshalb von großem praktischem Interesse, weil andere bekannte, bei Sepsis auftretende mögliche Biomarker wie bestimmte Cytokine (Interleukine, TNF) normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommende, instabile Moleküle darstellen, deren Bestimmung als solche für eine Routinediagnostik am Krankenbett viel zu kompliziert und arbeitsaufwendig und damit kostenaufwendig ist. Wie gemäß der vorliegenden Erfindung — und im Hinblick auf das bisherige medizinische Wissen völlig überraschend — festgestellt werden konnte, ist bei einer Sepsis der Procalcitonin Gehalt außerordentlich erhöht, so daß Konzentrationen im ng-Bereich (über 1 ng, insbesondere über 10 ng bis zu 500 ng und mehr pro ml Serums- oder Plasmaprobe) erhalten werden, während bei gesunden Personen mit den bekannten Verfahren zur Procalcitoninbestimmung kein Procalcitonin Gehalt feststellbar ist (Konzentrationen unter 0,1 ng/ml Probe). Gleichzeitig werden bei Sepsis gemäß der vorliegenden Erfindung keine erhöhten Calcitoninkonzentrationen beobachtet, was deshalb bemerkenswert ist, weil Procalcitonin bisher in der Regel als Calcitoninvorläufer angesehen wurde, dessen Auftreten auch zu einer Calcitoninbildung führt.

Das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zu bestimmende Peptid Procalcitonin und seine ggf. auftretenden proteolytischen Spaltprodukte sind bekannt, und es sind auch schon für eine quantitative und qualitative immundiagnostische Bestimmung geeignete Bestimmungsverfahren bekannt.

Procalcitonin ist ein Peptid aus 116 Aminosäuren, von dem bisher bekannt war, daß es als Zwischenstufe der zur Bildung des Peptidhormons Calcitonin führenden Translation/-Expression eines bestimmten Gens (CALC-1) in einer Reihe von Geweben, insbesondere den thyroidalen C-Zellen und in Tumorgewebe, als Vorläufer von Calcitonin auftritt, wobei dieses Ursprungsgen (CALC-1) außer der Bildung von Procalcitonin auch noch die Bildung eines zweiten, vasoaktiven Peptids steuert, das als proCGRP (procalcitonin-generated peptide) bezeichnet wird und sich in seiner Länge und im Sequenzbereich der Aminosäuren 51 bis 116 des Procalcitonins deutlich von diesem unterscheidet (vgl. *J. Biol. Chem.* (1986), 261, 31, S. 14386—14391).

Gemäß dem bekannten Wissen ist Procalcitonin ein proteolytisches Abbauprodukt des durch eine bestimmte Art der Genexpression des Gens CALC-1 erzeugten primären Proteins Prä-Procalcitonin und unterliegt in den bisher bekannten Fällen seines Auftretens in der Regel einem weiteren stufenweisen Abbau unter Freisetzung von reifem Calcitonin, das einer Sequenz von 32 Aminosäuren (Aminosäuren 60 bis 81 des Procalcitonins) entspricht. Dabei werden zuerst u. a. zwei größere Peptide gebildet, die als N-Procalcitonin-(1-57)-peptid und C-Procalcitonin-(60-116)-peptid bezeichnet werden können, wobei das letztgenannte Peptid dann weiter zu den Hormonen Calcitonin und zu dem als Katalcalcin bekannten Peptid gespalten werden kann (*Biochem. J.* (1988)

256, 245—250; und Cancer Res. 49, 6845—6851, 1989). Aus J. Biol. Chem. 226, 24627—24631 ist in jüngerer Zeit bekannt geworden, daß außer dem in den obigen Literaturstellen beschriebenen Procalcitonin in humanen thyroidalen C-Zellen auch eine Variante des Procalcitonins gebildet wird, die sich von ersterem durch die letzten 8 Aminosäuren des C-Terminus unterscheidet. Auch dieses Peptid ist als "Procalcitonin" im Sinne der vorliegenden Erfindung anzusehen, da die bei der Entwicklung der vorliegenden Erfindung angewandten immundiagnostischen Bestimmungsverfahren derzeit keine Unterscheidung der beiden Procalcitonine voneinander und von evtl. anderen nahe verwandten Peptiden ermöglichen. "Procalcitonin" im Sinne der vorliegenden Erfindung steht somit für eines oder mehrere Peptide, die das bekannte Molekül Procalcitonin, die oben beschriebene, am C-Terminus eine davon abweichende Aminosäurezusammensetzung aufweisende Variante davon sowie ggf. weitere existierende Varianten mit einer vergleichbaren Reaktivität in den zu ihrer Bestimmung eingesetzten selektiven immundiagnostischen Bestimmungsverfahren umfassen, insbesondere in dem nachfolgend unter Bezugnahme auf die Literaturstelle Cancer Res. 49, 6845—6851 (1989) beschriebenen monoklonalen immunoradiometrischen Assay.

Alle diese Peptide enthalten Peptidsequenzen von 57 Aminosäuren oder mehr, insbesondere 116 Aminosäuren wie das vollständige Procalcitonin, die der bekannten Sequenz des Procalcitonins entsprechen oder Teilssequenzen davon darstellen, wobei Abweichungen im Bereich der Aminosäuren, die den Aminosäuren 108 bis 116 des Procalcitonins entsprechen, möglich sind.

Was die bisherigen Versuche angeht, den Nachweis von Calcitonin und verwandten Peptiden zu diagnostischen Zwecken zu nutzen, so ist bekannt, daß Calcitonin ein wertvoller Biomarker (Tumormarker) für zahlreiche maligne Erkrankungen ist, und es wurden bereits eine Reihe von immundiagnostischen Bestimmungsverfahren zur spezifischen Bestimmung von Calcitonin entwickelt, die unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper durchgeführt werden (vgl. z. B. Clinica Chimica Acta, 174 (1988) S. 35—54; The Journal of Immunology, Vol. 141, S. 3156—3163; J. Endocr. (1988) 119, S. 351—357).

Auch zur Bestimmung von Calcitoninvorläufern wie Procalcitonin und C-Procalcitonin-(60-119)-peptid wurde bereits ein immundiagnostisches Bestimmungsverfahren entwickelt, das nach dem Prinzip des immunoradiometrischen Assays (IRMA) arbeitet und das die selektive Bestimmung von Procalcitonin neben Calcitonin dadurch ermöglicht, daß man ein Paar von monoklonalen Antikörpern verwendet, von denen der eine für eine außerhalb der Calcitoninsequenz liegende Region (die Aminosäuren 1 bis 11 des Katalcalcins bzw. die Aminosäuren 96—107 des Procalcitonins) spezifisch ist und z. B. in immobilisierter Form zur Extraktion von diese Sequenz enthaltenden Peptiden aus der Analysenprobe verwendet wird, während der zweite zum Aufbau des IRMA-Sandwich verwendete markierte monoklonale Antikörper für eine den Aminosäuren 11 bis 17 des Calcitonins (Aminosäuren 70 bis 76 des Procalcitonins) entsprechende Region spezifisch ist. Auf diese Weise werden in dem Immunoassay nur solche Peptide erkannt, die sowohl die Calcitoninregion als auch die Aminosäuren 1—11 der Katalcalcinregion aufweisen und somit entweder ein vollständiges Procalcitonin oder ein aus diesem erhaltenes Peptid mit den genannten Bereichen darstellen, z. B. das C-Procalcitonin-(60-116)-peptid (vgl. Cancer Res. 49, S. 6845—6851, (1989)). Von den verschiedenen zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörpern wurden bei dem bekannten Verfahren solche ausgewählt (Bezeichnungen mAbKC01 und mAbCT08), die Assoziationskonstanten im Bereich von  $K_{asn} = 0,9—3,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  aufwiesen. Für das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren läßt sich dieses bekannte Verfahren direkt oder unter Verwendung ähnlicher, auf der Basis der Offenbarung in J. Immunol., Vol. 141, S. 3156—3163, No. 9, (1988) erhältlicher monoklonaler Antikörper anwenden, wobei für eine Bestimmung, die die Procalcitoninzunahme auf besonders klare und für klinische Zwecke gut auswertbare Weise bestimmt, Paare von Antikörpern verwendet werden sollten, die ähnlich hohe Affinitäten aufweisen wie die oben beschriebenen. Für die in den nachfolgenden Beispielen beschriebenen Bestimmungen wurde ein Paar monoklonaler Antikörper verwendet, das den o. g. Antikörper mAbKC01 sowie einen Antikörper mAbCT21 umfaßte, wobei der Antikörper mAbCT21 sowohl was seine Bindung an das Procalcitoninmolekül als auch seine Affinität angeht, dem in der obigen Literaturstelle beschriebenen mAbCT08 sehr ähnlich war (Assoziationskonstante  $K_{asn} = 3,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ).

Das beschriebene Verfahren gemäß Cancer Res. 49, S. 6845—6851, 1989 liefert Konzentrationswerte für den Gehalt eines Procalcitonins oder des C-Procalcitonin-(60-119)-peptids oder beider in Proben bzw. unter der Voraussetzung, daß die Stabilitäten beider Peptide vergleichbar sind, einen Wert für die Ausgangs-Gesamtkonzentration des Procalcitonins in der Probe.

In der genannten Veröffentlichung wurde versucht, die Bestimmung von Procalcitonin im Hinblick auf eine Eignung als Tumormarker durchzuführen. Es wurde festgestellt, daß bei Tumorpacienten Procalcitoninspiegel und Calcitoninspiegel ein paralleles Verhalten zeigten, woraus geschlossen wurde, daß beide neoplastischen C-Zellen der Schilddrüse entstammten. In der genannten Veröffentlichung wurde ferner festgestellt, daß die Procalcitoninspiegel in einigen Fällen auch bei Patienten erhöht waren, die keine malignen Erkrankungen aufwiesen, sondern an bestimmten schweren Virusinfektionen litten. In diesen Fällen kam es zu keiner gleichzeitigen Erhöhung der Calcitoninspiegel. Diese Patienten waren keine Sepsispacienten, und ihre Erkrankungen standen in keiner Beziehung zu Sepsiserkrankungen.

Nachdem gemäß der vorliegenden Erfindung überraschenderweise festgestellt worden war, daß eine enge Korrelation zwischen den Procalcitoninspiegeln und dem Vorliegen und der Schwere einer Sepsis nachweisbar ist, wurden nachträgliche Überlegungen angestellt, in welchem Zusammenhang der Anstieg des Procalcitoninspiegels ohne gleichzeitiges Ansteigen des Calcitoninspiegels sowohl bei Sepsis als auch — in klar geringerem, in vielen Fällen eine direkte Unterscheidung von Sepsis gestattendem Ausmaße — bei Patienten mit bestimmten schweren Viruserkrankungen stehen könnte. Da bei einem Sepsispacienten, dem die Schilddrüse entfernt worden war, trotzdem die für Sepsis typische signifikante Erhöhung des Procalcitoninspiegels festgestellt werden konnte, war klar, daß im Falle von Sepsis das Procalcitonin nicht in der Schilddrüse gebildet wird, sondern ein anderes Organ zuständig ist. Nimmt man im Hinblick auf den erhöhten Procalcitoninspiegel bei Virushepatitis

als Arbeitshypothese an, daß dieses andere Organ die Leber ist, ließe sich der Anstieg des Procalcitoninspiegels einmal als direkte Auswirkung einer Viruserkrankung auf die Hepatocyten und in anderen Fällen als indirekte, aber wirksamere Einwirkung der Endotoxine, die von den für die Sepsis verantwortlichen Bakterien produziert werden, auf die gleichen Hepatocyten erklären. Es sei jedoch betont, daß diese ex post-Erklärung eine Arbeitshypothese ist und keine experimentell abgesicherte Theorie darstellt.

Das Auftreten erhöhter Procalcitoninspiegel bei schweren Viruserkrankungen hat für das erfindungsgemäße Verfahren zur Sepsisdiagnose die Auswirkung, daß wenn, wenn die Procalcitoninspiegel nur relativ geringfügig bis auf solche Werte erhöht sind, wie sie auch bei schweren Viruserkrankungen vorkommen, das Vorliegen einer solchen Viruserkrankung vor einer Diagnose auf Sepsis ausgeschlossen werden sollte.

Ferner ist ggf. bei Patienten mit chronischem Nierenversagen und dadurch gestörter Peptidausscheidung damit zu rechnen, daß die Spiegel von Peptiden wie Procalcitonin erhöht sind, ohne daß einer solchen Erhöhung in diesem Falle die gleiche klinische Relevanz zukommt wie bei in dieser Hinsicht gesunden Patienten. Die Berücksichtigung dieser Umstände ist für den klinischen Diagnostiker jedoch ohne besondere Schwierigkeiten möglich.

Die vorliegende Erfindung ist nicht auf eine Anwendung des oben beschriebenen bekannten spezifischen Bestimmungsverfahrens zur Procalcitoninbestimmung beschränkt, sondern erfaßt auch andere an sich bekannte Bestimmungsverfahren, zu denen auch unter Verwendung anderer monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, z. B. solcher mit einer Spezifität für das N-Procalcitonin-(1-57)-peptid und insbesondere dessen Aminosäuren 51 bis 57, arbeitende Verfahren gehören. So konnte bei einer gemeinsamen Verwendung polyklonaler Antikörper gegen Regionen des N-Procalcitonin-(1-57)-peptids anstelle von nAbKC01 zusammen mit dem im beschriebenen Verfahren verwendeten markierten monoklonalen Antikörper, der an die Calcitoninregion des Procalcitonins bindet, gezeigt werden, daß in beiden Fällen analoge Konzentrationswerte für den Procalcitonin Gehalt erhalten wurden, was aufgrund der Tatsache, daß im Falle der Verwendung der genannten polyklonalen Antikörper die erkannten Regionen nur bei dem intakten Procalcitoninpeptid innerhalb eines Moleküls vorliegen, den Schluß nahelegt, daß im Falle von Sepsis tatsächlich die Spiegel des intakten Procalcitonins erhöht sind und die daraus gebildeten Teilpeptide höchstens von untergeordneter Bedeutung sind.

Grundsätzlich kann das erfindungsgemäße Verfahren auch unter Bestimmung des Procalcitonins auf andere, nicht immundiagnostische Weise durchgeführt werden, z. B. mit Hilfe von HPLC, wenn solche Verfahren mit ausreichender Empfindlichkeit und Spezifität existieren oder entwickelt werden können.

Obwohl ferner die erfindungsgemäße Bestimmung des Procalcitonins derzeit vorzugsweise in Serums- oder Plasmaproben durchgeführt wird, erfaßt das erfindungsgemäße Verfahren grundsätzlich auch Bestimmungen von Procalcitonin in anderen biologischen Flüssigkeiten wie Vollblut und Urin, wenn sich herausstellen sollte, daß auch in diesen Flüssigkeiten auf reproduzierbare Weise Procalcitoninspiegel gemessen werden können.

Zum Stand der Technik ist noch darauf hinzuweisen, daß in Surgery, Vol. 108, 6, S. 1097—1101 berichtet wird, daß bei Patienten mit Sepsis der Plasmaspiegel des dem Calcitonin verwandten Peptids CGRP im pg-Bereich leicht erhöht war ( $14,9 \pm 3,2$  pg/ml gegenüber  $2,0 \pm 0,3$  pg/ml bei Normalpersonen). Dieser Befund erlaubt keinerlei Schlüsse auf die Spiegel anderer, verwandter Peptide, und die gegenüber dem erfindungsgemäßen Verfahren wesentlich niedrigeren Absolutkonzentrationen und relativen Steigerungen bei Sepsis gegenüber der Normalkonzentration lassen die Bestimmung von CGRP als Sepsismarker ungeeignet erscheinen.

In Lancet 1983, I, S. 294 wurde ferner berichtet, daß bei schwerer Meningokokkeninfektion von Kindern um das Doppelte bis Dreifache erhöhte Calcitoninspiegel festgestellt wurden, in einer anschließenden Veröffentlichung in *Pediatr. Res.* 1984; 18, S. 811 wurde jedoch richtiggestellt, daß die bestimmte Substanz wahrscheinlich nicht das intakte Calcitonin ist, wobei offenbleiben mußte, welche Substanz tatsächlich gemessen wurde. Der in den beschriebenen Fällen beobachtete Anstieg auf etwa das Dreifache des Normalwerts ist mit einem Anstieg des Procalcitonins bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in der Größenordnung eines 1000fachen Anstiegs zu vergleichen, was zeigt, daß die genannten Literaturstellen keine das erfindungsgemäße Verfahren betreffende Offenbarung darstellen.

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand von klinischen Daten, die die Relevanz der von ihm gelieferten Aussagen belegen, noch näher erläutert.

Alle Procalcitoninbestimmungen erfolgten dabei nach dem in *Cancer Res.* 49, S. 6845—6851, 1989 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von Procalcitonin unter Verwendung der monoklonalen Antikörper KC01 und CT21 (s. o.).

#### 1. Bestimmung der Procalcitoninspiegel bei Kindern, die aus verschiedenen Gründen im Krankenhaus behandelt wurden

Es wurden die Procalcitoninspiegel (pCT) verschiedener Gruppen von Kindern bestimmt, die aus verschiedenen Gründen in einem Krankenhaus behandelt wurden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Es ist zu erkennen, daß bei Sepsispatienten pCT (Procalcitoninspiegel) bis 180 ng/ml erhalten wurden, während die pCT-Werte für "normale" Viruserkrankungen maximal auf 2 ng/ml anstiegen und nur bei sehr schweren Viruserkrankungen des Darms und der Leber bis auf Werte von 16 ng/ml und in einem Falle bis 35 ng/ml anstiegen.

TABELLE 1

Gruppe	Alter (Jahre)	pCT (ng/ml)	Klinische Details
Kontrolle (n = 20)	0,3-10	<0,1	Krankenhausaufenthalt aus verschiedenen Gründen - keine Infektionen
Bakterielle Infektion			
mit Sepsis Kinder (n = 7)	0,5-8,5	16-180	5 Kinder mit Meningitis (3 Hämophilus, 2 Meningococcus, 1 mit Pneumokokkeninfektion der Lunge, 1 mit Staphylo- kokken und Steven-Johnson's Syndrom
Neugeborene (n = 6)	NN	13-160	6 Neugeborene mit positiver Blutkultur
Virusinfektion			
(n = 10)	NN-9	<0,1-2,0	3 mit Lymphocytenmeningitis 7 mit verschiedenen Virusin- fektionen (erhöhtes Interferon)
(n = 3)	0,1-5	1,1-16	2 mit Rotaviren-, 1 mit Korona- virusinfektionen
(n = 3)	2 - 5	1,5-35	Alle Hepatitis A

2. Korrelation der pCT-Spiegel bei Patienten mit Sepsis, bei denen der Krankheitsverlauf gleichzeitig nach dem APACHE II - Score verfolgt wurde, mit der Schwere ihrer Erkrankung

Bei 20 Sepsispatienten, die nach herzchirurgischen Eingriffen eine additive i. v.-IgG-Sepsistherapie erhielten, wurden die pCT-Spiegel fünf Tage verfolgt, wobei ihr Krankheitszustand gleichzeitig nach dem APACHE II-Score bewertet wurde. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 5
<b>APACHE II - Score</b>				
Responder (n=11)	26 ± 1	24 ± 2	23 ± 3	16 ± 1
Non-Responder (n=9)	28 ± 2	31 ± 2	31 ± 2	29 ± 3
<b>pCT</b>				
Responder (n=11)	87 ± 33 <sup>1</sup>	87 ± 37 <sup>1</sup>	104 ± 41 <sup>1,2</sup>	22 ± 7 <sup>1</sup>
Non-Responder (n=9)	259 ± 56 <sup>1</sup>	278 ± 61 <sup>1</sup>	214 ± 68 <sup>1</sup>	181 ± 66 <sup>1</sup>
<b>Letalität</b>				
Responder (n=11)	9 % <sup>3</sup>			
Non-Responder (n=9)	56 % <sup>3</sup>			

 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ <sup>1</sup>p<0,05 (M-W)<sup>2</sup>p<0,05 (Wilcoxon)<sup>3</sup>p<0,05 (Chi<sup>2</sup>)

Der Tabelle ist klar zu entnehmen, daß beim Ansprechen auf eine erfolgreiche Sepsistherapie (Responder) die pCT-Spiegel mit der Besserung des klinischen Zustands sanken, während sie bei einem Nichtansprechen auf die Behandlung (Non-Responder) nahezu unverändert hoch blieben. Gleichzeitig ist zu erkennen, daß bei den Non-Respondern die Ausgangs-pCT-Spiegel erheblich höher lagen als bei den Respondern, die ersteren also viel schwerer erkrankt waren. Im Vergleich zu den Werten des APACHE II-Scores geben die pCT-Werte die unterschiedlichen Schweregrade der Sepsiserkrankung erheblich klarer wieder, was auch durch die Zahlen für die Letalität bestätigt wird.

Diese Ergebnisse zeigen ferner, daß die begleitende Bestimmung des pCT-Spiegels während einer Sepsisbehandlung zu einem frühen Stadium zuverlässige Informationen zum Behandlungserfolg liefert, so daß ggf. eine frühzeitige Entscheidung bezüglich eines Wechsels der gewählten Behandlung, z. B. Wahl eines anderen Antibiotikums, möglich ist.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Verbrennungspatienten erhalten werden, bei denen es im Zusammenhang mit Hautverpflanzungen zu septischen Erkrankungen kam, die mit verschiedenen Antibiotika behandelt wurden. Ein Behandlungserfolg war stets von einem drastischen Absinken der pCT-Konzentration begleitet, und in einem Falle konnte ein an konstant bleibenden pCT-Konzentrationen erkennbares Nichtansprechen auf eine erste Antibiotikabehandlung frühzeitig durch einen Wechsel des Antibiotikums korrigiert werden, wobei sich das Ansprechen auf das zweite Antibiotikum sofort als Absinken des pCT-Spiegels zu erkennen gab.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Früherkennung, zur Erkennung des Schweregrads sowie zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung einer Sepsis, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten den Gehalt des Peptids Procalcitonin und/oder eines daraus gebildeten Teilpeptids, das nicht das reife Calcitonin ist, bestimmt und aus der festgestellten Anwesenheit und Menge des bestimmten Peptids auf das Vorliegen einer Sepsis, ihren Schweregrad und/oder den Erfolg einer therapeutischen Behandlung zurückschließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man a) Procalcitonin oder b) Procalcitonin das N-Procalcitonin-(1-57)-peptid und/oder das C-Procalcitonin-(60-116)-peptid bestimmt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das oder die jeweilige(n) Peptid(e) auf immundiagnostischem Wege unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers oder einer Kombination eines ersten monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers mit einem zweiten monoklonalen Antikörper bestimmt, die als solche oder in Kombination miteinander eine Spezifität für Procalcitonin oder daraus gebildete Peptide aufweisen und deren Unterscheidung von reifem Calcitonin und dem CGRP-Peptid ermöglichen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man das Procalcitonin mit Hilfe eines immunometrischen Assays bestimmt, bei dem zum Binden des Procalcitonins aus der Probe ein erster monoklonaler Antikörper verwendet wird, der das Procalcitonin in einer anderen Region bindet als der zur Markierung verwendete zweite monoklonale Antikörper, so daß eine Unterscheidung zwischen Procalcitonin und seinen proteolytischen Abbauprodukten, einschließlich Calcitonin, möglich ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man zum Binden des Procalcitonins neben dem ersten monoklonalen Antikörper mindestens einen weiteren monoklonalen Antikörper verwendet, der das Procalcitoninmolekül in einer anderen, weiteren Region bindet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Procalcitonin mit Hilfe eines immunometrischen Assays bestimmt, der selektiv a) das vollständige Procalcitonin oder b) das vollständige Procalcitonin sowie das C-Procalcitonin-(60-116)-peptid erkennt.
7. Verfahren nach Anspruch 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Procalcitonin mit Hilfe eines immunometrischen Assays bestimmt, der selektiv a) das vollständige Procalcitonin oder b) das vollständige

Procalcitonin sowie das N-Terminal Calcitonin-(1-57)-peptid erkennt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man aus Procalcitoniningehalten von mehr als 1 ng/ml Probe auf das mögliche Vorliegen einer Sepsis schließt und daß man Procalcitoniningehalte im Bereich von 10 ng/ml bis 500 ng/ml und mehr mit einer zunehmenden Schwere der Sepsis und einer verschlechterten Prognose korreliert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man gleichzeitig in einer parallelen Bestimmung prüft, ob der Calcitoninspiegel erhöht ist und man die Diagnose Sepsis bei fehlendem Nachweis erhöhter Calcitoninspiegel stellt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Procalcitoninspiegeln im Bereich bis etwa 20 ng/ml die Sepsisdiagnose dann stellt, wenn das Vorliegen einer schweren Viruserkrankung als Ursache für den erhöhten Procalcitoninspiegel ausgeschlossen werden kann.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Probe einer biologischen Flüssigkeit eine Serums- oder Plasmaprobe verwendet.

12. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bestimmung von Procalcitonin in Mengen von 0,1 bis 500 ng/ml Serums- oder Plasmaprobe enthält:

einen oder mehrere immobilisierte(n) erste(n) mono- oder polyklonale(n) Antikörper auf einem Träger zum Binden des Procalcitonins aus der Probe.

einen weiteren monoclonalen Antikörper, der eine Markierung trägt und Procalcitonin in einer Region bindet, die sich von der Bindungsregion des oder der ersten Antikörper(s) unterscheidet, sowie übliche Hilfssubstanzen.

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**